

University of Groningen

Vogelpest. Literatuurstudie naar de huidige kennis over de oorzaken en bestrijding van Influenza A bij mens en dier.

Lok, Tamar

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2004

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Lok, T. (2004). *Vogelpest. Literatuurstudie naar de huidige kennis over de oorzaken en bestrijding van Influenza A bij mens en dier.*

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

RuG

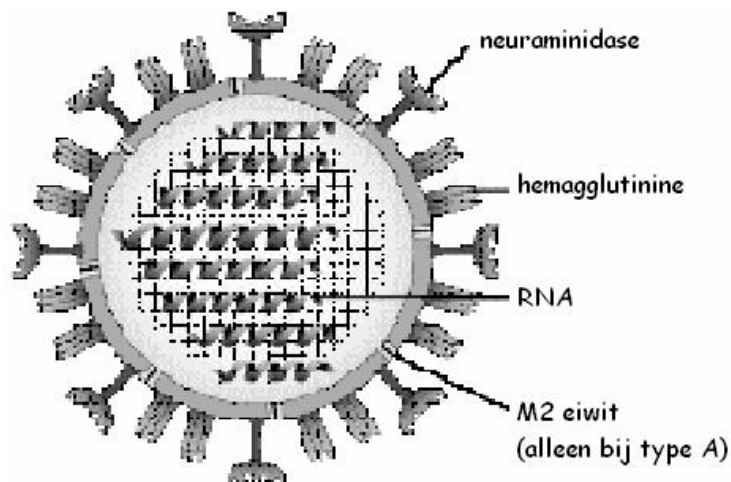
Ψ \vec{E} t' & N₂

\$ © ℋ Δ % Σ

ω ⊥ № [k] ë ∠ §

VOGELPEST

Literatuurstudie naar de huidige kennis over de
oorzaken en bestrijding van Influenza A bij
mens en dier



Tamar Lok

Wetenschapswinkel Biologie
Rapport 65
ISBN 90 367 1993 3

Vogelpest

Literatuurstudie naar de huidige kennis over de
oorzaken en bestrijding van Influenza A bij mens
en dier

Tamar Lok

Haren, april 2004

Wetenschapswinkel Biologie
Biologisch Centrum (RUG)
Kerklaan 30/Postbus 14
9750 AA Haren
Telefoon 050 363 2385
Telefax 050 363 5205
www.rug.nl/wetenschapswinkels

Project

Deze literatuurstudie is uitgevoerd door Tamar Lok in het kader van haar biologiëstudie aan de Rijksuniversiteit Groningen.

Het project werd begeleid door drs. Attie F. Bos (Wetenschapswinkel Biologie) die ook de eindredactie voerde.

INHOUDSOPGAVE

Inleiding	5
1. Wat is vogelpest?	7
1.1. Vogelpest: een influenzavirus	7
1.2. Influenza A bij pluimvee	8
1.3. Geschiedenis van influenzavirussen.....	9
2. Overdracht.....	11
2.1. Verspreiding influenza A.....	11
2.2. Moleculaire verspreiding	12
2.3. Gevoeligheid en immuun respons	13
3. Risico's voor de mens	15
3.1. Kans op epidemie of pandemie	15
3.2. Surveillance influenza A.....	16
4. Vogelpest in Nederland	17
5. Samenvattende discussie	19
6. Conclusies en aanbevelingen	21
Referenties	23

INLEIDING

De uitbraak van de vogelpest in Nederland in februari 2003 ligt nog vers in het geheugen. Vogelpest wordt veroorzaakt door een influenzavirus en wordt ook wel Aviaire Influenza genoemd. In 2003 zorgde Aviaire Influenza van het subtype H7N7 voor een epidemie waarvan 25 miljoen kippen en duizenden kalkoenen en hobbydieren het slachtoffer werden. Preventieve vaccinatie is volgens de regelgeving van de Europese Unie niet toegestaan waardoor men gedwongen was niet alleen de besmette dieren maar ook de gezonde dieren binnen een straal van 3 kilometer rond de infectiebron te ruimen (Galama 2003). Hoewel de overheid zich zeer heeft ingespannen de ziekte onder controle te krijgen leverde dat geen snelle resultaten op. De voornaamste reden hiervan bleek een gebrek aan kennis over de verspreiding van de ziekte te zijn.

Er zijn sterke aanwijzingen dat wilde watervogels zoals eenden, meeuwen en trekvogels de natuurlijke gastheren van influenzavirussen zijn. Bij deze soorten veroorzaken de virussen geen ernstige ziekteverschijnselen omdat ze zich aan de gastheer hebben aangepast. Andere dieren kunnen echter wel met deze influenzavirussen worden besmet. Het begrip vogelpest wordt gebruikt wanneer een hoogpathogeen virus zich bij pluimvee manifesteert. Kenmerkende symptomen zijn ernstige ziekteverschijnselen en hoge sterfte. Deze virussen vertegenwoordigen altijd subtype H5 of H7 van het type Influenza A. Deze subtypen hoeven niet altijd hoog pathogeen te zijn. Meestal raakt pluimvee eerst besmet met een onschuldige variant van Influenza A. Door enkele snelle mutaties kan uit deze onschuldige variant een hoogpathogene stam ontstaan (Suarez *et al.* 2000; Köhler & Voormolen 2003).

Dat het H7N7-virus ook bij mensen symptomen kon veroorzaken is algemeen bekend. Deze symptomen gaan soms gepaard met verschijnselen die op griep lijken. Er ontstond in 2003 echter grote onrust toen een dierenarts ten gevolge van de heersende vogelpestvirus overleed (Galama 2003). Aangenomen wordt dat besmetting niet plaatsvindt van mens op mens, maar dat mensen besmet raken door directe contacten met besmette dieren. (Suarez *et al.* 2000; Köhler & Voormolen 08-03-03). Sinds de vogelpestepidemie in 2003 wordt op alle pluimveebedrijven in Nederland periodiek een controle uitgevoerd op de milde variant van het vogelpestvirus.

Vanaf december 2003 staat het onderwerp vogelpest opnieuw in de belangstelling door meldingen van de gevreesde ziekte in het zuidoosten van Azië. Het gaat nu om Aviaire Influenza van het subtype H5N1. Naast miljoenen stuks pluimvee zijn in Vietnam en Thailand ook mensen overleden als gevolg van besmetting met het virus. Het ministerie van Landbouw, Visserij en Voedselveiligheid (LNV) heeft maatregelen genomen ter voorkoming van deze nieuwe variant van de Aviaire Influenza in Nederland. (www.minlnv.nl 27-01-2004).

Het doel van deze studie is een duidelijk beeld te krijgen van wat op dit moment bekend is over de vogelpest. In hoofdstuk 1 wordt aan de hand van de huidige kennis van influenza-A-virussen uitgelegd wat het vogelpestvirus is. In hoofdstuk 2 wordt aandacht besteed aan de overdracht van vogelvirussen. Hoe vindt deze overdracht plaats, welke dieren zijn gevoelig voor vogelvirussen en wat zou de oorzaak hiervan kunnen zijn? De risico's voor de mens worden in hoofdstuk 3 behandeld. In Hoofdstuk 4 wordt verslag gedaan van de uitbraak en de gevolgen van de vogelpest in Nederland in 2003. In hoofdstuk 5 wordt ingegaan op de kennis die nog ontbreekt en op mogelijke preventieve maatregelen. De conclusies staan in hoofdstuk 6.

1 WAT IS VOGELPEST?

1.1 Vogelpest: een influenzavirus

Vogelpest is een influenzavirus en wordt ook wel Aviaire Influenza (Klassieke Vogelpest) genoemd. Influenzavirussen behoren tot de familie *Orthomyxoviridae* en zijn enkelstrengs RNA-virussen. Deze kunnen aan de hand van de antigeenstructuur van het nucleocapside en de matrixeiwitten worden onderverdeeld in de typen A, B en C. Van de typen B en C zijn alleen infecties bij de mens bekend, terwijl type A is geïsoleerd in mensen, paarden, varkens en andere zoogdieren en daarnaast in een grote verscheidenheid aan tamme en wilde vogels (Suarez *et al.* 2000).

Type A kan verder worden onderverdeeld in subtypen aan de hand van de structuur van de viruseiwitten hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). Deze bevinden zich op de buitenste lipidemembraan van het virus (zie figuur 1). Hemagglutinine zorgt voor de hechting van het virus aan celreceptoren en de opname van het virus in de gastheer cel.

Neuraminidase heeft een enzymactiviteit die een rol speelt bij het vrijlaten van het virus uit de cel.

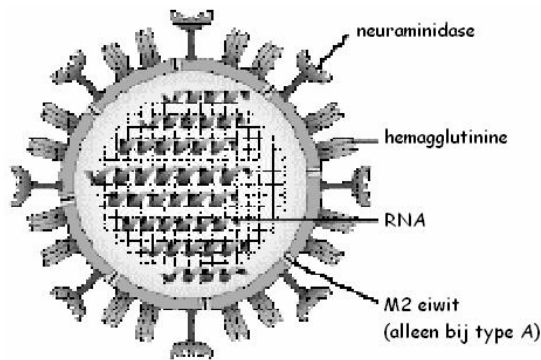
Sinds 1933 zijn er 16 verschillende HA- en 9 NA-typen geïsoleerd. Het 16^e HA type is pas recentelijk ontdekt (Köhler & Voormolen 2003).

Hoewel lastig is vast te stellen wat de exacte gastheerrange is van influenzavirussen, zijn er sterke aanwijzingen dat watervogels, in het bijzonder eenden, meeuwen en kustvogels, de (grootste groep) natuurlijke gastheren van influenzavirussen zijn. Alle HA- en NA-subtypen komen in vrijwel alle mogelijke combinaties voor bij deze soorten. Bovendien vertonen de virussen bij deze wilde watervogels een niet-virulent karakter, dat wil zeggen dat ze geen ernstige ziekteverschijnselen veroorzaken. De oorzaak hiervan is dat het virus zich heeft aangepast aan de gastheer. Hierdoor kan een eeuwig reservoir worden gecreëerd, omdat het afweersysteem het virus met rust laat (Tollis *et al.* 2002). Toch kunnen ook andere dieren geïnfecteerd worden door influenzavirussen. Zij worden dan echter gezien als afwijkende gastheren (Suarez, 2000).

Influenzavirussen staan erom bekend dat ze heel snel veranderen, met andere woorden, dat ze een hoge evolutiesnelheid hebben. Dit is het gevolg van twee belangrijke mechanismen, namelijk 'antigene shift' en 'antigene drift'.

Antigene shift treedt op wanneer verschillende soorten influenzavirussen bij gelijktijdige infectie een nieuwe combinatie vormen (recombineren). Dit proces kan leiden tot grote antigenen en mogelijk pathogene veranderingen (Tollis *et al.* 2002).

Daarnaast vertonen virussen een hoge 'error rate' tijdens de transcriptie van hun genoom vanwege de lage betrouwbaarheid van het RNA-polymerase (Stech *et al.*



Figuur 1. Structuur van virus met kenmerkende membraaneiwitten neuraminidase en hemagglutinine (Suarez *et al.* 2000)

1999). Hierdoor treden voortdurend kleine veranderingen op in het genoom, die onder immunologische druk tot veranderingen in het subtype HA of NA kunnen leiden. Dit wordt antigene drift genoemd.

1.2 Influenza A bij pluimvee

Influenzavirussen vertonen bij natuurlijke gastheren (wilde watervogels) een relatief lage mutatiesnelheid, in tegenstelling tot de hoge mutatiesnelheden die gevonden worden bij zoogdieren en pluimvee zoals kippen en kalkoenen. Hierdoor kan een virus zich snel aanpassen aan zijn nieuwe omgeving (Suarez, 2000). Daarnaast is bijvoorbeeld bij wilde kalkoenen nog nooit een influenzavirus aangetroffen (Davidson *et al.* 1988). Dit zijn belangrijke aanwijzingen dat zoogdieren en pluimvee niet tot het natuurlijke gastheerreservoir van influenzavirussen behoren.

Wanneer pluimvee besmet wordt met het avian influenzavirus kan het ziektebeeld heel verschillend verlopen. Onderscheid wordt gemaakt tussen 'low pathogenic avian influenza' (LPAI) en 'high pathogenic avian influenza' (HPAI). Het onderscheid hiertussen is gebaseerd op de 'intravenous pathogenicity index' (IVPI) van het geïsoleerde virus en de aminozuursequentie van de klievingsplaats van HA (Wood *et al.* 1993). Deze index wordt bepaald door inoculatie van 0.2 ml van een 1/10 verdunde dooiervloeistof van geïnfecteerde bevruchte eieren in 4 tot 6 weken oude niet geïnfecteerde kuikens. Het virus wordt als hoog pathogeen beschouwd als 1) minstens 6 van de 8 geïncubeerde kuikens binnen 10 dagen sterven, of 2) het een subtype H5 of H7 betreft dat een aminozuursequentie heeft die overeenkomt met die van HPAI-virussen, of 3) elk ander HA-subtype dat 1 tot 5 kuikens doodt en kan groeien in een celcultuur in de afwezigheid van trypsine (Suarez *et al.* 2000, Tollis *et al.* 2002). Zie paragraaf 2.2 voor een beter begrip van voorwaarde 3.

Het begrip vogelpest wordt gebruikt wanneer een hoog pathogeen virus zich bij pluimvee heeft gemanifesteerd. Typische symptomen van HPAI zijn ernstige ziekte en hoge sterfte. De sterfte kan oplopen tot 100%. Deze virussen vertegenwoordigen altijd subtype H5 of H7, hoewel deze subtypen niet altijd hoog pathogeen hoeven te zijn. LPAI-stammen veroorzaken een mildere ziekte, die meestal alleen het ademhalingsstelsel aantast.

1.3 Geschiedenis van influenzavirussen

In 1918-1919 stierven over de hele wereld ruim 20 miljoen mensen aan een mysterieuze ziekte. Pas in 1933 werd ontdekt dat het hier om een griepvirus ging. Sindsdien is men begonnen met het maken van antistoffen tegen de griep. De mysterieuze ziekte van toen staat nu beter bekend als de ‘Spaanse Griep’ en is de grootste pandemie die door een griepvirus werd veroorzaakt. Het akelige van de griep is dat hij door mutatie steeds weer in andere gedaanten kan verschijnen en kan toeslaan voordat hiervoor een geschikt vaccin is gemaakt. Zo zorgden de Aziatische griep in 1957 en de Hong Kong griep in 1968 alleen in de Verenigde Staten al voor tienduizenden slachtoffers.

Het eerste griepvirus moet ontstaan zijn door een oversprong van het virus van zijn natuurlijke gastheer naar de mens, eventueel via een tussengastheer zoals pluimvee. Wanneer dit voor de eerste keer is gebeurd blijft onduidelijk, in Europa is dit mogelijk in de 12de eeuw gebeurd (Laver *et al.* 2002). Vóór deze oversprong moet influenza A dus al bij vogels hebben bestaan.

De eerste uitbraak van de vogelpest vond plaats in 1878 maar werd niet als zodanig herkend. De uitbraak werd toen met ‘fowl plague’ (gevogelteplaag) aangeduid (Alexander 2000). Pas in 1955 werd de relatie tussen dit virus en andere mildere virussen in vogels en het influenza A-virus in zoogdieren gevonden (Schafer, 1955). Sindsdien wordt bij uitbraken van de vogelpest het betreffende subtype geïdentificeerd. Sinds 1958 zijn 20 (HPAI) uitbraken vastgesteld, 5 bij kalkoenen en 15 bij kippen (Alexander 2000; Tolles 2002). Zie voor een overzicht tabel 1.

Subtype	Land	Jaar	Soort
H5N1	Schotland	1959	Kippen
H7N3	Engeland	1963	Kalkoenen
H5N9	Ontario	1966	Kalkoenen
H7N7	Victoria	1976	Kippen
H7N7	Duitsland	1979	Kippen
H7N7	Engeland	1979	Kalkoenen
H5N2	Pennsylvania	1983	Kippen
H5N8	Ierland	1983	Kalkoenen
H7N7	Victoria	1985	Kippen
H5N1	Engeland	1991/1992	Kalkoenen
H7N3	Victoria	1992	Kippen
H7N3	Queensland	1994	Kippen
H5N2	Mexico	1994	Kippen
H7N3	Pakistan	1994	Kippen
H7N4	N-Z Wales	1997	Kippen
H5N1	Hong Kong	1997	Kippen
H5N2	Italië	1997	Kippen
H7N1	Italië	1999/2000	Kippen
H7N7	Nederland	2003	Kippen
H5N1	Zuidoost Azië	2003/2004	Kippen

Tabel 1. Gerapporteerde uitbraken van HP Aviaire Influenza –virussen bij pluimvee vanaf 1958 (Alexander 2000; Tollis 2002; Galama 2003; www.minlnv.nl 27-01-2004)

Pas sinds midden jaren '70 van de vorige eeuw is men systematisch begonnen met een moleculaire analyse van influenza A bij wilde vogels. Hiervoor worden de feces van vogels over de hele wereld geanalyseerd en worden de eventueel aanwezige virussen geïsoleerd en onderzocht (Alexander 2000).

2 OVERDRACHT

2.1 Verspreiding influenza

Uit surveillanciestudies blijkt dat tijdens de trek gemiddeld 15% van de wilde eenden en ganzen en ongeveer 2% van alle andere watervogels besmet is met een influenza A-virus. Zulke virussen zijn goed in staat zich in de luchtwegen en in de darmen te vermenigvuldigen. Daardoor zitten de feces van vogels vol met virus. Voor de trek verzamelen veel watervogels zich op meren en wetlands, waar ze hun voedsel zoeken temidden van elkanders uitwerpselen (Alexander 2000). Het water wordt daardoor een ware virussoep. In niet te warm (10 °C), pH-neutraal water kan een dergelijk virus wekenlang actief blijven. Hierdoor raken tijdens de trek heel veel watervogels besmet met influenzavirussen. Het is goed mogelijk dat door de stressvolle omstandigheden tijdens de trek de besmetting met de virussen nog wordt vergemakkelijkt (Köhler & Voormolen 2003).

Verspreiding vindt niet alleen via mest plaats, maar kan ook via de luchtwegen en oogvocht worden overgedragen. Direct contact is dan wel noodzakelijk. Bij besmetting van pluimvee speelt secundaire verspreiding van het virus ook een belangrijke rol. Dit kan optreden door direct contact met besmette uitwerpselen of door het vervoeren van besmet materiaal (zoals kratten waar mest aan is blijven zitten). Mensen spelen hierbij een belangrijke rol door het dragen van besmette kleding, het vervoeren van vogels en eieren en het afleveren van voedsel (Alexander 2000, Tollis *et al.* 2002). Voor uitgebreidere informatie over overdracht naar de mens, zie hoofdstuk 3.

Onderzoek suggereert dat de eiwitten HA en NA mogelijke beperkende factoren zijn voor deze overdracht vanwege verschillen tussen receptoren van de influenzavirus op de doelcellen van wilde vogels, tamme vogels en zoogdieren. De receptoren van tamme eenden komen redelijk overeen met die van wilde vogels, waardoor ze vrij gemakkelijk kunnen worden geïnfecteerd. Dat is de reden dat wordt verondersteld dat tamme eenden een belangrijke rol spelen bij de overdracht naar pluimvee en zoogdieren (Suarez, 2000). Voorbeelden van directe overdracht van AI-virussen van wilde watervogels naar zoogdieren zijn echter ook bekend, waaronder 3 gevallen van besmetting van een mens. Door de soortspecificiteit zal dit echter een zeldzaam fenomeen blijven (Tollis *et al.* 2002).

2.2 Moleculaire verspreiding

Het virus komt het lichaam binnen via de luchtwegen of via het oogvocht. Hoe het virus de cel in kan dringen, zich kan vermenigvuldigen en verspreiden, wordt duidelijker wanneer eerst de structuur van een viruspartikel wordt uitgelegd. Suarez *et al.* 2000 geven hiervan de volgende beschrijving. Het RNA van influenza A virussen bestaat uit 8 gensegmenten die coderen voor 10 virale eiwitten. Deze eiwitten kunnen worden onderverdeeld in drie categorieën: oppervlakte-eiwitten (HA, NA en M2), de interne eiwitten (PA, PB1 en PB2, NP, M1, NS2) en non-structurele eiwitten die niet in het viruspartikel zitten (NS1). Voor functiebeschrijving, zie tabel 2.

Gensegment	Grootte (aantal basen)	Eiwit	Functie
1	2341	PB2	Transcriptase: kapsel binding
2	2341	PB1	Transcriptase: verlenging
3	2233	PA	Transcriptase: protease activiteit
4	1778	HA	Hemagglutinine
5	1565	NP	Nucleoeiwit: RNA binding; deel van transcriptase complex; nucleair/cytoplasmatisch transport van vRNA
6	1413	NA	Neuraminidase: vrijlating van viron
7	1027	M1	Matrix eiwit: belangrijk component van viron
		M2	Integraal membraan eiwit: ion kanaal
8	890	NS1	Niet-structureel: kern; effecten op cellulair RNA transport, splitsing, translatie
		NS2	Niet-structureel: kern + cytoplasma; functie onbekend

Tabel 2. Overzicht van de functies van de 10 virale eiwitten van een influenza A-virus (Suarez *et al.* 2000)

Het eiwit HA bestaat uit twee polipeptidesegmenten, HA1 en HA2 genaamd (zie ook figuur 2). HA1 zorgt ervoor dat HA gebonden kan worden aan de neuraminezuur- receptoren. Dit is de eerste stap van een influenza-infectie. Vervolgens zorgt de vrije amino-terminus van de subunit HA2 voor fusie van het viruspartikel met de gastheercel (Skehel *et al.* 2002). Daarna komt het RNA vrij in de cel en kan door middel van de andere viruseiwitten (RNA-replicases) gerepliceerd worden. Daarbij worden in de cel nieuwe viruspartikeltjes gevormd die vervolgens weer van de cel moeten worden afgesnoerd. Hierbij speelt het eiwit NA een belangrijke rol. NA is een enzymatisch actief eiwit dat zorgt voor het klieven van het neuraminezuur waardoor het viruspartikel van het celoppervlak bevrijd kan worden en nieuwe gastheercellen kan gaan infecteren. Dit proces is vereenvoudigd weergegeven in figuur 3.



Figuur 3. Vermenigvuldiging van virus in gastheercel (Skehel *et al.* 2002)

Het primaire verschil tussen een LPAI- en een HPAI-virus is de mogelijkheid tot replicatie: lokale replicatie of replicatie in het hele lichaam. Dit verschil in replicatieplaats is gerelateerd aan de klieving van het hemagglutinine precursor eiwit (HA0) in de componenten HA1 en HA2. Dit proces wordt gerealiseerd door proteases van de gastheer en is noodzakelijk om het eiwit functioneel te maken waardoor het virus infecterend wordt (Rott, 1992). Het HA van een HPAI-virus kan worden gekleefd door proteases die in vrijwel elke lichaamscel te vinden zijn, terwijl de (trypsinachtige) proteases, nodig voor klieving bij LPAI-virussen, alleen in het ademhalingsstelsel en de darmen zijn te vinden (Alexander 2000). Hierdoor is het gebied waarop het virus kan opereren bij HPAI-virussen aanzienlijk groter, waardoor het veel meer schade kan aanrichten (dus ook aan vitale organen). Welke verschillen in de klievingsplaats van het HA-eiwit bepalen welke gastheer-proteases wel of niet functioneel zijn, wordt in de volgende paragraaf nader uitgelegd.

2.3 Gevoeligheid en immuun respons

Influenza-A-virussen komen behalve bij hun natuurlijke gastheer, wilde vogels, dus ook voor bij tamme vogels (waaronder pluimvee) en zoogdieren.

De meeste virussen bij wilde vogels zijn niet-virulent. Uitzonderingen hierop zijn de subtypen H5N3 bij visdiefjes (*Sterna hirundo*) in Zuid-Afrika (Becker 1966) en H7N1 bij wilde vogels in de buurt van uitbraken die veroorzaakt zijn door HPAI-virussen bij pluimvee (Capua *et al.* 2000).

Tamme vogels die gevoelig zijn voor vogelvirussen zijn kippen, kalkoenen, parelhoenders, kwartels, fazanten, patrijzen, pauwen, eenden, ganzen, zwanen, duiven (alleen van de soort *Columbia livia*), struisvogels, emoes en nandoes. Besmetting van tamme vogels, met name pluimvee, kan echter leiden tot massale sterfte. De weinige gevallen van besmetting van zoogdieren met een vogelvirus leidde in de meeste gevallen tot onschuldige ziekteverschijnselen en besmetting van mensen met alleen een vogelvirus (dus zonder reassortment met een menselijk griepvirus) heeft nog nooit tot een epidemie geleid.

De vraag is hoe een virus, dat in wilde vogels zo onschuldig lijkt, na oversprong naar pluimvee zich kan manifesteren als een zeer dodelijke griep. De theoretische veronderstelling luidt dat een virus zijn hoog pathogene eigenschappen pas vergaart na oversprong van wilde vogels naar pluimvee (Perdue *et al.* 1998). Er bestaan echter geen directe bewijzen voor de hypothese, dat HPAI-virussen ontstaan zijn uit LPAI stammen in wilde vogels (Tollis *et al.* 2002). Wel is aangetoond dat influenza-virussen significante selectiedruk ondervinden in pluimvee, waardoor veranderingen in de nucleotidesequentie van de eiwitten HA en NA kunnen optreden. Zo bleek dat glycosylatie van de HA-kop en deleties in de NA-steel (Banks *et al.* 2001, Matrosovich *et al.* 1999), maar ook insertie van een veelvoudige aminozuursequentie op de klievingsplaats van het HA-eiwit (Ito *et al.* 2001), de virulentie van het virus kan vergroten. Voor een efficiënte werking van het virus is het echter wel noodzakelijk dat de activiteit van het HA- en NA-eiwit goed in balans zijn (Wagner *et al.* 2000).

Eenzelfde virus kan zeer uiteenlopende ziekteverschijnselen veroorzaken bij verschillende tamme vogelsoorten. Bij kippen en kalkoenen kunnen de verschijnselen veel ernstiger zijn dan bijvoorbeeld bij tamme eenden. Dit heeft onder andere te

maken met de aard van de virussen die bij deze dieren veelal infecties veroorzaken en de immuunrespons die een virusinfectie opwekt bij de gastheer. Een hoge antilichaam respons wordt gevonden bij kippen en kalkoenen in vergelijking tot eenden. (Suarez *et al.* 2000). Daarnaast kunnen secundaire bacteriële infecties en andere omgevingsfactoren ook een rol spelen bij het ziektebeeld van een virus (Tollis *et al.* 2002).

Neutraliserende antilichamen worden geproduceerd tegen de oppervlakte viruseiwitten HA, NA en M2. Antilichamen tegen HA en NA zijn belangrijke factoren voor complete bescherming tegen infectie en ziekte (Suarez *et al.* 2000). Een virus kan zich pas goed verspreiden wanneer het een voor het lichaam onbekend subtype betreft, waar nog geen functionele antilichamen voor zijn aangemaakt. Immune respons komt daardoor langzamer op gang, waardoor het virus veel schade kan aanrichten.

Vaccinatie betekent het inspuiten van een kleine hoeveelheid inactief virus, waardoor het lichaam antilichamen gaat aanmaken. Deze vaccinatie wordt meestal gericht op het subtype HA. Daardoor wordt voorkomen dat het virus cellen kan infecteren. Een dergelijke vaccinatie is alleen gericht op een heel specifiek influenza-A-subtype en is alleen mogelijk wanneer het betreffende subtype waartegen bescherming nodig is, bekend is.

3 RISICO'S VOOR DE MENS

3.1 Kans op epidemie of pandemie

Zoals eerder vermeld kunnen mensen niet alleen met Influenza A, maar ook met Influenza B en C worden besmet. Influenza-A-virussen die bij de mens in het verleden een pandemie hebben veroorzaakt waren van het subtype H1, H2 of H3. Onder pandemie wordt verstaan de introductie bij de mens van een nieuw subtype van het influenza-A-virus met een nieuwe combinatie van een bepaald H- met een bepaald N-eiwit (De Jong *et al.* 1999).

Een vogelvirus wordt pas gevaarlijk wanneer een nieuwe variant van vogels naar de mens overspringt en zich vervolgens goed kan repliceren en kan worden overgedragen naar andere mensen. De immuunrespons van de mens zal in eerste instantie ontoereikend zijn voor de nieuwe eiwitten HA en NA, waardoor een epidemie of pandemie tot de mogelijkheden gaat behoren.

Aanvankelijk dacht men dat een vogelvirus (via pluimvee) eerst een varken moest infecteren, daar een aantal mutaties zou moeten ondergaan, alvorens een mens besmet zou kunnen raken met het betreffende virus. Dit is echter achterhaald. Hoewel rechtstreekse besmetting van wilde vogels op mensen een zeer zeldzaam fenomeen is, zijn meerdere gevallen bekend waarbij mensen door pluimvee besmet werden met een influenza A-virus. In kippen ondervindt een dergelijk virus sterke selectiekrachten, welke tijdens het aanpassingsproces kunnen leiden tot onomkeerbare veranderingen in zowel het HA- als het NA-eiwit. Pas na deze veranderingen zouden ook mensen met het virus besmet kunnen worden (Matrosovich *et al.* 1999). In het verleden is dit verscheidene malen gebeurd. In Hong Kong werden in 1997 18 mensen ziek door het H5N1-virus, waarvan er 6 stierven. In deze gevallen had geen reassortment met een menselijk griepvirus plaatsgevonden en was er ook geen sprake van een zoogdier als tussengastheer. In maart 1999 werden 2 mensen ziek van een H9N2-virus en in februari 2003 stierven nog eens 2 mensen aan een sterk verwant virus van het H5N1-virus dat in 1997 voor sterfgevallen had gezorgd. In al deze gevallen bleek het virus afkomstig van pluimvee (Shaw *et al.* 2002).

In 2003 sprong een H7N7-subtype in Nederland 80 keer over naar de mens. Hoewel dit in de meeste gevallen leidde tot een onschuldige oogaandoening, is één dierenarts bezweken aan de besmetting.

De uitbraak in 2003/2004 in het zuidoosten van Azië heeft volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) al 15 dodelijke slachtoffers in Vietnam en 7 in Thailand geëist (Volkskrant 28-02-2004).

Hoewel influenza-A-virussen afkomstig van pluimvee blijkbaar ernstige ziekte en zelfs sterfte kunnen veroorzaken, wil dit nog niet zeggen dat het ook een gevaar voor de volksgezondheid is. Daarvoor zal een virus eerst de eigenschap moeten verkrijgen om snel te kunnen repliceren en overgedragen te kunnen worden van mens op mens. Er bestaat nog weinig bewijs voor mens op mens besmetting met vogelvirussen. Het is namelijk moeilijk te bepalen of er geen interactie met pluimvee heeft plaatsgevonden. Bovendien gaan replicatie en overdracht te langzaam om een epidemie te kunnen veroorzaken. Onderzoek wees uit dat de specificiteit van de receptorbinding van het vogel-HA niet onmiddellijk verandert wanneer het HA wordt geïntroduceerd in mensen. Aanpassing van deze specificiteit vindt pas na een aantal

replicaties plaats en is noodzakelijk voor effectieve overdracht tussen mensen (Matrosovich *et al.* 1999).

Moleculaire en genetische analyse van de virussen H5N1 in Hong Kong en H9N2 in Italië wezen uit dat de residuen van de genen, coderend voor de nonglyco-eiwitten (NS, M, NP, PA, PB1, PB2), erg verschillen tussen de naar de mens overgesprongen virussen en die van de andere vogelvirussequenties (Shaw *et al.* 2002).

Toch hebben influenzavirussen in het verleden tot grote uitbraken geleid, namelijk in 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) en in 1977 (H1N1) (Capua *et al.* 2002). In 2 van de 4 gevallen (1957 en 1968) is met zekerheid vastgesteld dat het om een pandemie ging waarbij een vogelvirus zich gemengd had met een menselijk griepvirus. Het is bekend dat varkens geïnfecteerd kunnen worden met zowel vogel als menselijke stammen van het influenza-A-virus. Varkens zouden daardoor het mengvat kunnen zijn waar reassortanten ontstaan. In het verleden zijn er wel mensen besmet met zo'n reassortant (Claas *et al.* 1994), maar het blijft onbewezen dat één van de pandemieën op een dergelijke wijze is ontstaan (Laver *et al.* 2002) en dat niet de mens zelf als mengvat fungeerde.

Op dit moment circuleren varianten van type H3N2- en H1N1-virussen, samen met stammen van influenza type B (Laver *et al.* 2002).

Zoals eerder gezegd moet de activiteit van HA en NA goed overeenkomen. Een slechte overeenkomst kan een mogelijke barrière zijn voor reassortment van menselijke en vogel influenzavirussen (Rudneva *et al.* 1996).

3.2 Recente ontwikkeling Influenza A

Sinds de jaren '70 van de vorige eeuw worden subtypen van Influenza A onderzocht in wilde vogels. Pas de laatste 5 jaar doet men in Rotterdam systematisch onderzoek naar bestaande subtypen in vogelpoep om voorbereid te zijn op de mogelijke subtypen die bij de mens tot epidemieën of pandemieën kunnen leiden, opdat zo snel mogelijk geschikte vaccins gemaakt kunnen worden (Köhler & Voormolen, 2003).

De constante evolutie en antigene verandering van influenzavirussen binnen een subtype in mensen zorgt ervoor dat vaccins minder efficiënt worden. Vaccins tegen de griep worden daarom elk jaar aangepast aan de virussen die op dat moment rondwaren en een griep prik moet dus elk jaar opnieuw gehaald worden voor het verkrijgen van een optimale bescherming.

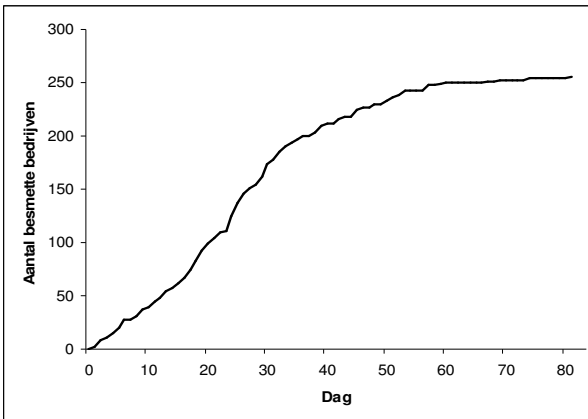
Wanneer een onbekend subtype van Influenza A opduikt, lijkt het erop dat de eerste bescherming tegen zo'n onbekend virus het meest effectief is bij het gebruik van neuraminidase-inhibitoren zoals Relenza en Tamiflu. Antilichamen tegen het neuraminidase-viruseiwit kunnen infectie van virusgevoelige cellen niet voorkomen maar zorgen ervoor dat nieuwe viruspartikels niet van de gastheer cel kunnen worden afgesnoerd, waardoor geen nieuwe cellen geïnfecteerd kunnen worden (Laver *et al.* 2002).

4 VOGELPEST IN NEDERLAND

De meest recente uitbraak van de vogelpest in Nederland vond plaats in februari 2003 en duurde tot in mei van hetzelfde jaar. Tijdens deze uitbraak werden ter bestrijding 30 miljoen kippen, eenden en kalkoenen geruimd en werden 80 mensen besmet met het betreffende vogelvirus. Nederland was al sinds 1926 vrij geweest van besmetting met een vogelpestvirus. Er zullen in het verleden ongetwijfeld meer uitbraken zijn geweest, maar goede registratie en adequate kennis over het bestaan van verschillende subtypen van Influenza A ontbrak in die tijd nog.

Het vogelpestvirus dat in 2003 voor een epidemie bij pluimvee zorgde was van het subtype H7N7. Het virus werd waarschijnlijk door wilde watervogels overgedragen op leghennen die een paar uren per dag buiten mochten rondscharrelen (Köhler & Voormolen, 2003). Drie jaar geleden werd al een mildere vorm van dit virus in de uitwerpselen van trekvogels in Nederland geconstateerd. Het virus is vermoedelijk ontstaan door versmelting van twee wilde eendenvirussen. Het hemagglutinine-eiwit van het virus heeft de meeste verwantschap met een H7N3- virus dat in 2000 in de feces van een wilde eend werd gevonden. Het neuraminidase- eiwit vertoonde de meeste overeenkomsten met het H1N7-virus van een Nederlandse slobeend uit 1999. Het is wetenschappelijk bewezen dat pluimvee, gehouden op een manier waarbij contact met wilde vogels mogelijk is, een grotere kans lopen om besmet te raken met influenzavirussen dan pluimvee dat in een vogelvrije omgeving wordt gehouden (Alexander 2000). De bio-industrie in Nederland kan met zo'n vogelvrije omgeving vergeleken worden. Hoewel de bio-industrie niet verantwoordelijk kan worden gesteld voor de oversprong van een wilde vogelvirus naar pluimvee, is de dichtheid aan vogels in de bio-industrie extreem hoog waardoor het virus razendsnel om zich heen kan grijpen en de bestrijding hiervan grote moeilijkheden met zich meebrengt. Vogelpest hoort tot de lijst met A-ziektes (niet te verwarren met Influenza A!). Dit is een lijst van zeer besmettelijke dierziekten die door de Europese Unie is vastgesteld. Aan de hand van Europese regelgeving voor de bestrijding van deze A-ziekten was het beleid van het ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Voedselveiligheid (LNV) erop gericht het vogelpestvirus zoveel mogelijk in te dammen (www.minlnv.nl; www.minvws.nl). Eerst werden de ernstig verdachte bedrijven geruimd, dat wil zeggen dat alle AI-gevoelige dieren op die bedrijven werden gedood en vervolgens gebeurde dat ook op de bedrijven in de omgeving. Aanvankelijk werd een gebied binnen een straal van 1 km geruimd. Nadat bleek dat het virus nog steeds wist te ontsnappen is deze afstand vergroot tot een straal van 3 km. Tegelijkertijd werd getracht ervoor te zorgen dat het virus zich niet buiten het afgebakende gebied kon verspreiden. Daartoe werden allerlei beperkende maatregelen getroffen voor het vervoer van AI-gevoelige dieren en hun producten. Daarnaast werden maatregelen ingesteld om ervoor te zorgen dat het virus zich niet via contacten of andere transporten kon verspreiden. Toch heeft het bijna 3 maanden geduurd voor het virus geen nieuwe besmettingen meer veroorzaakte. Zie figuur 4 voor een overzicht van het verloop van het aantal besmettingen in de tijd.

Het virus was dodelijk voor kippen en kalkoenen terwijl andere tamme vogels er weinig last van leken te hebben. Ook varkens werden besmet. Doordat er geen sprake



Figuur 4. Aantal bedrijven besmet met het vogelpestvirus. Dag 1 is 04-03-2003 (www.minlnv.nl)

was van mutaties kreeg het virus via die weg weinig kans en kon worden voorkomen dat het gevaarlijk werd voor de mens. Mensen zijn wel rechtstreeks door het vogelvirus besmet, maar in de meeste gevallen leidde dit tot een onschuldige oogontsteking, alhoewel een persoon (een dierenarts) is bezweken aan de ziekteverschijnselen. In geen van de gevallen had menging plaatsgevonden met een menselijk griepvirus.

SAMENVATTENDE DISCUSSIE

De geschiedenis van influenza-A-virussen is goed gedocumenteerd en de kennis over de structuur van deze virussen neemt toe. Toch is de huidige kennis niet toereikend om een solide oplossing te kunnen vinden voor de uitbraak van vogelpest. De angst is nog steeds groot dat een griepvirus met voor het menselijk lichaam onbekende eigenschappen een enorme epidemie onder de mensheid zal veroorzaken. Het grote probleem van influenza-A-virussen is dat deze voortdurend aan veranderingen onderhevig zijn en het bijna onmogelijk is om te voorspellen wanneer veranderingen zullen optreden en welke gevolgen die zullen hebben.

Het is bewezen dat vogelpest kan ontstaan wanneer overdracht van een vogelvirus plaatsvindt van een wilde vogel naar pluimvee. De omstandigheden die zo'n oversprong bevorderen blijven echter onduidelijk. De eigenschappen van de viruseiwitten HA en NA bepalen de soortspecificiteit van een influenza-A-virus en zorgen ervoor dat een virus niet zomaar van de ene soort naar de andere overspringt. Zo lijkt de oversprong van wilde watervogels naar tamme eenden gemakkelijker te gaan doordat de verwantschap van wilde watervogels met tamme eenden groter is dan die met pluimvee. De stap naar pluimvee zou dan ook kleiner worden wanneer tamme eenden en pluimvee tegelijk worden gehouden. Toch speelt toeval ook een grote rol bij de oversprong. De veranderingen in de HA- en NA-eiwitten zouden pas ontstaan na zo'n toevallige overdracht, waardoor het heel moeilijk is te voorspellen of een virus succesvol zal worden in een 'afwijkende' gastheer. Het feit dat de uitbraken van laag pathogene dan wel hoog pathogene vogelvirussen bij pluimvee niet heel erg vaak voorkomen, bewijst dat de overdracht niet gemakkelijk gaat.

Het blijkt dat de virus die vogelpest veroorzaakt bij pluimvee geheel onschuldig is voor zijn natuurlijke gastheer. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat een virus een veel hogere selectiedruk ondervindt in pluimvee, omdat pluimvee niet de natuurlijke gastheer van vogelvirussen is. Door deze hoge selectiedruk zouden toevallige veranderingen tijdens de replicatie van het virus een grotere kans hebben om een selectievoordeel te hebben. Op deze manier zouden de hoog pathogene eigenschappen van een vogelvirus pas na de oversprong naar pluimvee ontstaan. Gebleken is echter dat eenzelfde virus, dat bij kippen en kalkoenen tot zeer ernstige ziekteverschijnselen leidt, bij andere tamme vogels veel onschuldiger is. Dit zou te maken kunnen hebben met het verschil in immuunrespons, waarbij kippen en kalkoenen een aanzienlijk sterkere immuunrespons hebben op virusinfecties dan bijvoorbeeld tamme eenden. Hoe deze verschillen in immuunrespons precies tot stand zijn gekomen is onzeker. Verwantschap met natuurlijke gastheren zou een rol kunnen spelen. Toch lijkt het onwaarschijnlijk dat een hoge of lage immuunrespons tot zulke grote verschillen in ziektebeeld kunnen leiden.

De uitbraken van de vogelpest in Nederland (2003) en in Italië (1999/2000) waren moeilijk te bedwingen. In Italië werd dit voornamelijk veroorzaakt doordat tegelijkertijd laag pathogene virussen rondwaarden. Terwijl hoog pathogene virussen duidelijk herkenbaar zijn doordat ze ernstige ziekteverschijnselen veroorzaken, kunnen laag pathogene virussen lange tijd onopgemerkt blijven en door mutaties tot een nieuw hoog pathogeen virus leiden. In Nederland is niet met zekerheid te zeggen of er sprake was van een laag pathogeen virus. Wel was met name de hoge dichtheid

aan pluimvee de oorzaak van de bestrijdingsproblemen. Het houden van vogels zal altijd gepaard blijven gaan met af en toe een uitbraak van een vogelziekte. Hoewel tegen veel ziekten ingeënt kan worden, zullen er ziekten blijven bestaan, zoals Influenza A, die door de constante verandering nou eenmaal moeilijk te voorkomen zijn. Er zal naar andere oplossingen gezocht moeten worden om de uitbraak van dergelijke ziekten te beperken of te voorkomen. Een verandering in de wijze van pluimveehouderij is één van de mogelijke oplossingen. Door een extensievere wijze van veehouderij kan een ziekte als vogelpest zich minder snel verspreiden, waardoor bestrijding gemakkelijker wordt en de ruiming van miljoenen vogels voorkomen zou kunnen worden.

Daarnaast bestaat de mogelijkheid tot vaccinatie. Hoewel preventieve vaccinatie tegen vogelpestvirussen weinig zin heeft - aangezien deze voortdurend in andere gedaanten terug kunnen komen – zou de mogelijkheid tot vaccinatie als alternatief voor het ruimen van pluimvee heroverwogen moeten worden. Export van gevaccineerd pluimvee is op dit moment verboden binnen de EU, omdat gevaccineerd pluimvee niet te onderscheiden zou zijn van besmet pluimvee, waardoor het risico van besmetting op Europese schaal erg groot zou zijn. Toch zijn er ontwikkelingen waarbij dit onderscheid tussen vaccinatie en besmetting wel degelijk te maken is. In hoeverre gevaccineerde kippen het vogelpestvirus nog steeds kunnen verspreiden is niet bekend en zou verder onderzocht moeten worden.

6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

- Vogelpest is een influenza-A-virus dat zich als hoog pathogeen virus bij pluimvee kan manifesteren.
- De grootste groep natuurlijke gastheren van influenzavirussen zijn wilde watervogels zoals kustvogels, meeuwen en eenden.
- Verspreiding van influenzavirussen kan direct (via mest, luchtwegen of oogvocht) of indirect (via 'besmet' materiaal) plaatsvinden.
- Een viruspartikel van Influenza A bestaat uit 10 virale eiwitten, waaronder de belangrijke oppervlakte-eiwitten neuraminidase (NA) en hemagglutinine (HA).
- De structuur van het hemagglutinine-eiwit is bepalend voor de virulentie van het virus; alleen de subtypen H5 en H7 kunnen hoog pathogeen zijn.
- Antilichamen tegen hemagglutinine en neuraminidase zijn belangrijke factoren voor complete bescherming tegen infectie en ziekte.
- De plaats van replicatie bepaalt de pathogeniteit van het virus.
- Vogelvirussen die van wilde vogels of pluimvee naar de mens overspringen bezitten nog geen eigenschappen om zich snel te kunnen verspreiden.
- De huidige kennis is ontoereikend om uitbraken van vogelpest te kunnen voorspellen.
- Het in 2003 in Nederland heersende vogelpestvirus van het subtype H7N7 was door de bio-industrie erg moeilijk te bestrijden.
- Vaccinatie als middel voor de bestrijding van uitbraken van vogelpest zou als alternatief voor ruiming heroverwogen moeten worden.
- Om in de toekomst adequater met de uitbraken van de onvoorspelbare vogelpest om te kunnen gaan moeten nieuwe mogelijkheden worden onderzocht om de verspreiding van vogelpest te verminderen en de kwaliteit van de bestrijding te verbeteren.

REFERENCES

- Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* **74**: 3-13.
- Banks, J., E.M. Speidel, I. Capua, A. Fioretti, A. Piccirillo, E.H. Moore, L. Plowright & D.J. Alexander (2001). Changes in the HA and NA genes prior to the emergence of HPAI H7N1 avian influenza viruses in Italy. *International Congress Series* **1219**: 363-367.
- Baum, L.G. & J.C. Paulson (1991). The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology* **180**: 10-15.
- Becker, W.B. (1966). The isolation and classification of Tern virus: influenza A – Tern South Africa – 1961. *Journal of Hygiene* **64**: 309-320.
- Capua, I., B. Grossele, E. Bertoli & P. Cordioli (2000). Monitoring for highly pathogenic avian influenza in wild birds in Italy. *Veterinary Record* **147**: 640.
- Capua, I. & D.J. Alexander (2002). Avian influenza and human health. *Acta Tropica* **83**: 1-6.
- Claas, E.C., Y. Kawaoka, J.C. de Jong, N. Masurel & R.G. Webster (1994). Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology* **204**: 453-457.
- Davidson, W.R., H.W. Yoder, M. Brugh & V.F. Nettles (1988). Serological monitoring of eastern wild turkeys for antibodies to *Mycoplasma* spp. and avian influenza viruses. *Journal of Wildlife Diseases* **24**: 348-351.
- Galama, J.M.D. (2003). Vogelppest en oseltamivir: een terugblik. *Ned. Tijdschrift Geneeskde* **47** (23): 1100-1103.
- Ito, T., H. Goto, E. Yamamoto, H. Tanaka, M. Takeuchi, M. Kuwayama, Y. Kawaoka & K. Otsuki (2001). Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *Journal of Virology* **75**: 4439-4443.
- Jong, J.C. de, G.F. Rimmelzwaan, R.A.M. Fouchier & A.D.E. Osterhaus (1999). Influenzapandemieën: verleden en toekomst. *Ned. Tijdsch Geneeskde* **143** (40): 1988-1991.
- Köhler, W. & S. Voormolen (2003). De Gelderse Griep: Wilde eendenpoep leidde tot uitbraak van klassieke vogelppest. *NRC Handelsblad*, 08-03-2003.
- Laver, G. & E. Garman (2002). Pandemic influenza : its origin and control. *Microbes and Infection* **4**: 1309-1316.
- Matrosovich, M., N. Zhou, Y. Kawaoka & R. Webster (1999). The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology* **73** (2): 1146-1155.
- Perdue, M., J. Crawford, M. Garcia, J. Latimer, D. Swayne (1998). Occurrence and possible mechanisms of cleavage site insertions in the avian influenza hemagglutinin gene. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia. US Animal Health Association*, pp. 182-193.

- Roo, R. de (2004). Mondkapjes, gasslangen en kruitwagens. Duizenden kippen worden in korte tijd door koolmonoxide van het leven beroofd. *Dagblad van het Noorden*, 15-03-2004.
- Rott, R. (1992). The pathogenic determinant of influenza virus. *Veterinary Microbiology* **33**: 303-310.
- Rudneva, I.A., E.I. Sklyanskaya, O.S. Barulina, S.S. Yamnikova, V.P. Kovaleva, I.V. Tsvetkova & N.V. Kaverin (1996). Phenotypic expression of HA-NA combinations in human-avian influenza A virus reassortants. *Archives of Virology* **141**: 1091-1099.
- Schäfer, W. (1955). Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest. *Zeitschrift für Naturforschung* **10b**: 81-91.
- Shaw, M., L. Cooper, X. Xu, W. Thompson, S. Krauss, Y. Guan, N. Zhou, A. Klimov, N. Cox, R. Webster, W. Lim, K. Shortridge & K. Subbarao (2002). Molecular changes associated with the transmission of avian influenza A H5N1 and H9N2 viruses to humans. *Journal of Medical Virology* **66**: 107-114.
- Skehel, J.J. & D.C. Wiley (2002). Influenza haemagglutinin. *Vaccine* **20**: S51-S54.
- Stech, J., X. Xiong, C. Scholtissek & R.G. Webster (1999). Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *Journal of Virology* **73**: 1878-1884.
- Suarez, D.L. (2000). Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology* **74**: 15-27.
- Suarez, D.L. & S. Schultz-Cherry (2000). Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 269-283.
- Tollis, M. & L. Di Trani (2002). Recent developments in avian influenza research: epidemiology and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal* **164**: 202-215.
- Volkskrant (2004). Vogelgriep ziekte door in ZO-Azië. *Volkskrant*, 28-01-2004.
- Wagner, R., T. Wolff, A. Herwig, S. Pleschka & H.D. Klenk (2000). Interdependence of haemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *Journal of Virology* **74**: 6316-6323.
- Wood, G.W., J.W. McCauley, J.B. Bashiruddin & D.J. Alexander (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Archives of Virology* **130**: 209-217.